УДК 619: 615. 373: 658.562

Сусский Е.В., Ночевный В.Т., Смоленский В.И., Ночевная Т.В.
(ФГУП «Армавирская биофабрика», Саратовский НИВИ, ФГБУ «ВГНКИ», ЗАО «Микроген»)

СИСТЕМА ПОСЕВНЫХ МАТЕРИАЛОВ – ФАКТОР СТАБИЛЬНОСТИ СЕРИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА АНТИГЕНОВ И ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК КРОВИ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: антигены, посевной материал сыворотка крови, стандартизация.

Вступление России во Всемирную торговую организацию (ВТО) требует не только модернизации, повышения эффективности и экономичности производства, но и стандартизации технологических процессов (ТП), повышения чувствительности и надежности методов контроля качества бактериальных и вирусных антигенов, лечебных и иммунобиологических препаратов (ИБП).

Решение указанных задач предполагает не только совершенствование и стандартизацию схемы производства питательных сред (ПС), бактериальных и вирусных антигенов, но и подготовки и контроля качества посевных материалов (ПМ) в соответствии с требованиями GMP, отечественных и международных стандартов [1-4].

Цель работы – показать значимость и эффективность ПМ, предназначенных для изготовления высокоактивных бактериальных и вирусных антигенов и эффективность их применения на модели серийного производства «Сыворотки против пастереллеза, сальнонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота».

Материалы и методы. В работе использовали штаммы микроорганизмов: P.multocida 8683 (А), 656 (В) и Т80 (Д), P.haemolityca (A1); S.typhimurium 371 и S.dublin; E.coli 0115 № 115/2, 078: K80 № 320 и продуценты адгезивных антигенов, термостабильных и термолабильных токсинов 0115: К88 № 453-37/17; 0141; К99 № 454-37/17; 09: К103: 987Р № 397-37/14; 0101: F41 № 397-37/14, а также вирусы парагриппа-3 (ПГ-3) штамм ПТК 45/86 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ) – штамм ТК – А/ВИЭВ, полученные на перевиваемой линии клеток MDBK.

Культуры пастерелл, сальмонелл и эшерихий были полученны из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ» и обладали характерными культуральными, морфологическими, ферментативными, антигенными и вирулентными свойствами.

Изготовление посевных материалов. Работу осуществляли в соответствии с требованиями ФЗ-184 «О техническом регулировании», с учетом требований государственных стандартов: ГОСТ 1.4.-2004, ГОСТ 1.5.-2004, ГОСТ 1.5.-2001 и ГОСТ Р 52249-2009. Главный (master seed-MS) и рабочий (working seed-WS) посевные материалы готовили соответственно из 1 и 2 генерации указанных бактерийный и вирусных штаммов. Культуры бактерий в концентрации 1 млрд микробных тел в см^3 и вирусов в дозах 7.0-7.5 lg ТДЦ 50/см^3 смешивали с защитной средой (ЗС) ВГНКИ-3 в соотношении 1:1, фасовали в ампулы по 2 см3) или флаконы по 5 см3, лиофилизировали и контролировали по основным биологическим показателям [5].

Главный и рабочий посевные материалы хранили при температуре -40 -70º С и 4-6ºС соответственно, контролировали по внешнему виду, отсутствию посторонних примесей, наличию вакуума, растворимости, массовой доли влаги. Определяли отсутствие контаминации посторенней микрофлорой, оценивали вирулентность, морфологические, культуральные и ферментативные свойства подтверждали серогрупповую принадлежность.

Подготовленные MS и WS были проверены специалистами ФГБУ «ВГНКИ» на соответствие требованиям СТО Армавирской биофабрики и аттестованы в качестве ПМ. Рабочие расплодки (productin seed - PS) получали на основе WS, контролировали по указанным показателям и использовали для серийного производства бактериальных и вирусных антигенов.

Главный (MSB) и рабочий (WSB) банки перевиваемой линии клеток MDBK с концентрацией не ниже 1,0 млн/см^3 гото-

вили роллерным методом из аттестованного пула клеток 1-2 и 2-3 пассажей, полученных из коллекции ФГБУ «ВГНКИ». В суспензию изолированных клеток вносили по 10% фетальной СК и DMSO и фасовали по 2см³ в пластиковые пробирки объемом 5см³. Эквилибрацию клеток тест-культуры осуществляли при 4ºC в течении часа, далее криопробирки помещали в холодильник при температуре (-70)ºC на сутки, затем подвергали глубокому затормаживанию и длительному хранению в жидком азоте. Эффективность криоконсервирования оценивали по жизнеспособности, ростовому потенциалу, отсутствию контаминации клеток агентами различной природы.

Изготовление питательной среды. Бульон Хоттинтера (БХ) готовили по традиционной технологии в соответствии с требованиями ГОСТ 29311-92. Содержание общего белка, аминного азота, пептона, триптофана, аммиака, фосфора сахара, пептидов и пептидных фракций и аминокислот определяли традиционными методами [6].

Культивирование бактерий. Производство бактериальных антигенов осуществляли стационарным способом в бутылях (контроль) и методом периодического культивирования в биореакторе «Торнадо» при оптимальных технологических параметрах. Ростовой потенциал БХ и метаболизм микроорганизмов оценивали по продолжительности фаз приспособления (tлаг) и логарифмического роста (tлог), максимальной удельной скорости роста (Vmax) бактерий, длительности времени одной генерации (μmin) и уровню накопления бактерий (7,8).

Результаты исследований.

Использование в практике работы биопредприятий различных по качеству белоксодержащих материалов не позволяет серийно готовить стандартные по ростовым свойствам гидролизатные ПС. Представляло интерес, оценить влияние физико-химических показателей качества гидролизатных ПС на метаболизм и уровень накопления микроорганизмов, используемых при изготовлении комплексного антигена для производства поливалентной СК против респираторно-кишечных болезней крупного рогатого скота (КРС).

Экспериментально показано, что длительность ферментативного гидролиза и уровень аминного азота (АА) являются объективными показателями качества и ростового потенциала (РП) полученных серий гидролизатов. Установлена прямая зависимость уровня накопления пастерелл, сальмонелл и эшерихий от концентрации АА в бульона Хоттинтера [6]. Максимальное накопление S.dublin 373(49,8±0,49 – 51,8±0,80 млрд/см³) и E.coli 320 (50,0±0,0 – 53,8±1,07 млрд/см³) регистрировали в образах БХ, содержащих не менее 230 мг % АА. Уменьшение концентрации АА ниже указанного уровня сопровождалось достоверным, снижением накопления сальмонелл и эшерихий соответственно на 6,2 и 9,4 млдр/см³.

При производстве пастереллезного антигена аналогичной закономерности в зависимости от концентрации АА не было. Отмеченно однако, что при увеличении АА выше 200 мг % процесс накопления пастерелл был более стабильным и позволял накапливать их в концентрации 20,0±0,71 – 21,8±0,92 млрд/см³. Содержание пептона (1,20 – 1,71 мг %) и триптофана (5,0 – 6,4 мг %) в изученных концентрациях не оказывали существенного влияния на накопления указанных микроорганизмов (табл.1).

Анализ полученных данных и результатов производственной деятельности предприятия свидетельствует о важности и необходимости дифференцированного подхода к выбору качественных серий БХ, содержащих не менее 200 мг % АА, что оправдано и экономически обосновано.

Для повышения эффективности и стандартизации результатов серийного производства бактериальных и вирусных антигенов были подготовлены и апробированы лиофильно-высущенные образцы главного и рабочего ПМ. Сухие стандартные образцы ПМ с остаточной влажностью не более 3% обладали характерными культурально-морфологическими, генетическими и ферментативными свойствам в течение 2-х лет (срок наблюдения) при оптимальных условиях хранения.

Выживаемость клеток MDBK главного и рабочего банков после размораживания составляла 87-94%, а исходная морфология и ростовые свойства восстанавливались через 2-3 пассажа. Объем банков клеток позволял обеспечивать бесперебойное производство высокоактивных антигенов вирусов ПГ-3 и ИРТ стандартным клеточным субстратом в течение 10-15 лет (табл.1).

Рабочие посевные материалы (WS) бактерий и вирусов по 1-3 ампулы (флакона) постоянно использовали для изготовления их рабочих расплодок (Production seed), предназначенных для получения се-

Таблица 1

Схема изготовления и контроля качества посевных материалов и антигенов для производства сыворотки против респираторно-кишечных болезней крупного рогатого скота

Технологические операции	Наименование микроорганизмов			
	Пастереллы	Сальмонеллы	Эшерихии	
			Соматичесикие антигены	Антигены АД (ТЛ и ТС токсины)
Производственные штаммы	P.multocida -8683 (A) -656 (B) -T80 (Д) P.haemolityca -169 (A1)	S.typhimurium -371 S.dublin -373	E.coli -115/(O115) -320(O78:K80)	E.coli -O115:K88 -O141:K99 -O9:K103:987P -O101:F41
Характеристика ПМ				
Количество ПМ (шт)	4	2	3	4
Количество: - MS (шт)	18	20	20	17
- WS (шт)	185	207	183	230
Жизнеспособность М (%)				
Условия культивирования бактерии				
Показатели БХ:				
• аминный азот (мг %)	185-206	240-260	200-230	
• пептиды 1000				
Доза инокулята (млрд/см³)	0,5	1,0	1,0	
Длительность культивирования (час)	9-10	10-14	11-12	
Подача глюкозы (%)	Дробно до 0,01-0,3	Дробно до 0,05-0,15	-	
Накопление бактерий (млрд/см³)				
• биореактор	23,6±0,6	51,8±0,80	53,8±1,07	
• бутыли (контроль)	2,9±0,18	13,8±0,58	9,14±0,30	
• модернизированный реактор (контроль)	9,3±0,30	51,2±0,60	50,4±0,80	
Технологические процессы подготовки антигенов				
Объединение антигенов	В равных объемах			
Осаждение микробов	Сепарирование при 7-8 тыс. об/мин			
Супернатант	Утилизация при (1,31±1)ºС-2 часа			Содержит тлитс токсины*
Ресуспендирование осадка	Супернатант с ТС и ТЛ токсинаты*			ФМБ
Рабочая концентрация микробов (млрд/см³)	20	10	10	80-120 Сепарирование
Объект инактивации	Соматические антигены клеток бактерий			Супернатант*
Инактиватор	Формалин (0,3% формальдегида)			
Сроки инактивации при (39±1)ºС, сут	2	14-16**	14-16	14-16
Контроль антигенов: -стерильность -безвредность для БМ	С Б	С Б	С Б	С Б
Сроки хранения антигенов при (4-6)ºС не более, мес	3	6	6	

Условные обозначения: ПМ – посевной материал; БМ – белые мыши;
С – стерилен; Б – безвреден; АД – адгезивные антигены;
ФМБ – фосфатно-мочевой буфер;
MS - Master seed – главный ПМ;
WS - Working seed – рабочий ПМ;
*- соматические капсульные и адгезивные антигены объединяют в соотношении 2:1

рийных продуктов. Этот технологический прием оказался чрезвычайно эффективным и обеспечивал стабильное производство достаточно активных антигенов (пастерелл (23,6±0,60 млрд/см³), сальмонелл (51,8±0,8 млрд/см³) и эшерихий (53,8±1,07 млдр/см³), ПГ-3 (7,39±0,08 lg ТДЦ 50/см³) и ИРТ (7,54±0,10 lg ТДЦ 50/см³)) в промышленных объектах, а также позволял исключить риск контаминации их различными возбудителями и, как результат, повысить качество и снизить себестоимость конечного продукта.

Для количественной оценки показателей технологических процессов культивирования микроорганизмов были определены продолжительность фаз приспособления (tлаг), логарифмического роста (tлог), минимальное время генерации одного цикла бактерий (Gmin) и максимальная удельная скорость роста (μmax) пастерелл, сальмонелл и эшерихий [7].

Таблица 2

Показатели технологических процессов глубинного культивирования пастерелл, сальмонелл и эшерихий

Наименование микроорганизмов	Наименование показателей			
	Максимальная удельная скорость роста (μ_{max}) 1/час	Минимальное время генерации (G_{min}) , час	Продолжительнсть логарифмической фазы роста ($t_{лог}$), час	Продолжительность фазы приспособления($t_{лаг}$), час
P.multocida T-80	0,35	1,97	3,6	Практически отсутствует
S.typhimurium 371	2,11	0,33	3,0	0,2
E.coli 320	2,04	0,34	3,1	0,2

В таблице 2 показано, что предложенная технология культивирования микроорганизмов оказалась достаточно эффективной и характеризовалась минимальной фазой приспособления, длительной фазой экспотенциального роста и максимальным накоплением биомассы. Непродолжительная фаза приспособления (Тлаг) свидетельствовала об оптимальных условиях культивирования, высокой жизнеспрособности и ростовом потенциале микроорганизмов, а также подтверждала хорошее качество БХ.

Показатели длительности экспотенциальной фазы (Тлог), высокой удельной скорости роста (μmax) и минимальное время генерации (Gmin), также указывали на высокий ростовой потенциал питательных сред и результативность технологического процесса периодического кулльтивирования микроорганизмов.

Постоянное использование стандартных по ростовым качествам серий БХ и посевных материалов, замена стационарного метода культивирования микроорганизмов на периодический метод с дробной подачей раствора глюкозы, позволили сократить сроки максимального накопления пастерелл, сальмонелл и эшерихий на 10-12 часов, повысить уровень накопления бакмассы соответственно в 8,36 и 5,2 раза, уменьшить потребность в ПС и в 2,5-3 раза снизить затраты на производство стандартных по активности антигенов. Полученные результаты достигнуты за счет интенсификации процессов культивирования бактерий, вследствии чего увеличились удельная скорость (μmax) и продолжительность логарифмической фазы роста микроорганизмов (tлог), сократились, продолжительность лаг-фазы (tлаг) и время получения одной генерации (Gmin). Окончание процесса периодического культивирования и сбор бакмассы для производства активных антигенов целесообразно проводить на первом этапе стационарной фазы роста микроорганизмов, что обеспечивает сохранность антигенных свойств и жизнеспособности пастерелл, сальмонелл и эшерихий на уровне 90,94 и 96% (табл. 2).

«Гипериммунную сыворотку против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита» получали на волах-продуцентах традиционным способом с использованием стандартизированных по активности бактериальных и вирусных антигенов.

Рабочая схема гипериммунизации доноров включала 10 в/м инъекций комплексного инактивированного бактериального антигена в возрастающих объемах (от 2-4 до 30-60 мл) с интервалом 4 суток и в/м введения на первом этапе «Вакцины

против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного скота сухой культуральной ассоциированной», а затем культурального антигена вирусов ПГ-3 и ИРТ, изготовленных роллерным методом, с активностью не ниже 7,0 lg ТЦД 50/см³ в объеме 4 мл соответственно с интервалом 4 и 8 суток. [9].

Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Антительный ответ волов-продуцентов, гипериммунизированных антигенами пастерелл, сальмонелл, эшерихий, ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота

№ п/п	Дни инъекций антигенов	Наименование антигенов									
		Пастереллы		Сальмонеллы		Эшерихии		ПГ-3		ИРТ	
		Д см³	ТА в РА log2	Д см³	ТА в РА* log2	Д см³	ТА в РА* log2	Д см³	ТА в РН log2	Д см³	ТА в РН log2
1	1	2	2,0	4	-	4	10	4	1,0	4	1,0
2	5	4	3,0	8	10	8	20				
3	9	6	3,2	12	12,5	12	25	4	3,0	4	2,0
4	13	8	4,0	16	25	16	50				
5	17	10	5,0	20	50	20	100	4	4,0	4	3,0
6	21	12	6,0	24	100	24	200				
7	25	15	7,0	30	200	30	400	4	5,0	4	4,0
8	29	20	8,0	40	400	40	800				
9	33	25	9,0	50	800	50	1600	4	6,0-6,5	4	5,5
10	37	30	10,0	60	1600	60	3200		6,5-7,0		5,5-6,0
Результаты		132	10,0	264	1600	264	3200	20	7,0	20	6,0

Обозначения: Д – объем антигена, см^3;
ТА – титр антител;
РА – реакция агглютинации;
РН – реакция нейтрализации;
*- обратная величина разведения сыворотки крови, положительно реагирующей в РА

Как видно из таблицы, предложенная схема гипериммунизации ВП обеспечивала устойчивый прирост специфических антител к пастереллезному антигену с 2,0 до 10,0 log2, сальмонеллезному с 0 до 1:1600 и эшерихиозному с 1:10 до 1:3200 в РА. Кроме того, в СК были обнаружены антитела к адгезивным антигелам (К88, К99 987Р, F41) с активностью 1:320 - 1:6400 в РА, термолабильным и термостабильным токсинам в титрах 1:2 – 1:4 в РДП.

При введении вирусных антигенов ПГ-3 и ИРТ также отмечали выраженную сероконверсию с приростом антител от 1,0 до 6,0-7,0 log2 в РН. Экспериментально установлено, что в процессе длительной эксплуатации волов-продуцентов титры антител к указанным антигенам существенно не изменялись.

За период 2004-2008 гг. было изготовлено 125 серий поливалентной СК против респираторно-кишечных болезней КРС объемом 12995 л. Количество специфических антител (титр) в составе поливалентной СК соответствовало требованиям действующего стандарта и позволяло обеспечивать защиту 94,5-100% телят от заражения полевыми возбудителями пастереллеза, сальмонеллеза и колибактериоза.

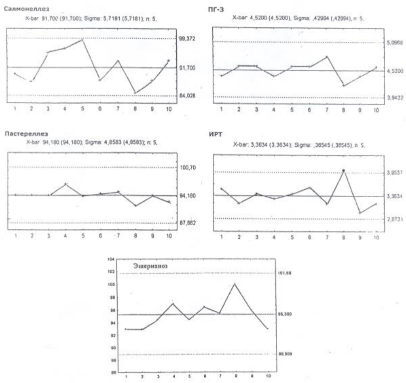
Однако, титры антител в поливалентной СК к антигенам ПГ-3 и ИРТ были не всегда стабильными и, зачастую, не превышали значений 4,54±0,04 и 3,34±0,06 log2 и не защищали животных от инфицирования в условиях хозяйств, неблагополучных по данным болезням. Существенное повышение титров противовирусных антител до 7,33±0,14 и 5,33±0,16 log2, было достигнуто за счет увеличения инфекционной активности антигенов до 7,0-7,5 lg ТЦД 50/см³ и пересмотра схемы гипериммунизации с увеличением интервалов до 8 суток.

Закономерная воспроизводимость процесса получения серийного производства поливалентной сыворотки была подтверждена при помощи контрольной карты Шухарта. [10]. Установлено, что показатели активности серий данного препарата, изготовленных за 5-летний период, находились в пределах статистических границ ±3δ, что указывало на стабильность ТП производства. (рис.1).

Таким образом, итогом исследований явилась организация на предприятии серийного выпуска высокоактивной гипериммунной СК против респираторно-ки-

Рисунок 1.

Оценка стабильности технологических процессов производства поливалентной СК по показателю антигенной активности компонентов за 2004-2008 гг. методом контрольных карт Шухарта



шечных болезней КРС. Положительный результат был достигнут за счет внедрения системы ПМ, применения аттестованной культуральной модели и гидролизатных ПС, отвечающих требованиям метаболизма микроорганизмов, широкого использования статистических методов анализа параметров технологических процессов, рациональной схемы изготовления вирусных и бактериальных антигенов, своевременных корректирующих процедур гипериммунизации и эксплуатации ВП.

За период 2009-2011 гг. было изготовлено и реализовано 90940 л поливалентной СК, отвечающей запросам потребителей. Многолетний опыт работы биопредприятия свидетельствовал о стандартности и воспроизводимости ТП, высоком качестве и востребованности практикой конечного продукта.

Окончательный анализ представленных данных свидетельствует о том, что одним из необходимых условий обеспечения высого качества отечественных биопрепаратов является создание системы посевных материалов и стандартизация субстратов, используемых для накопления бактериальной и вирусной биомассы. Рациональная реализация установленных подходов гарантирует не только стабильность серийного получения антигенов в больших объемах, но и позволяет существенно повысить эффективность гипериммунной сыворотки и уменьшить её безопасность за счет минимизации риска контаминации конечного продукта возбудителями различной природы.

Резюме: В статье обоснована необходимость внедрения в производство биологических препаратов системы посевных материалов и современных технологий с целью повышения качества лечебных сывороток крови животных.

SUMMARY
In this paper the necessity of introduction of seed material system and modern technologies into manufacturing of biological preparations to improve the quality of therapeutic animal serums is justified.

Keywords: antigens, seed material, serum, standardization.

Литература

1. Промышленная технология производства противобактерийных препаратов /Е.А. Рубан, Н.В. Мельник, Е.А. Непоклонов и др.: Под. ред. А.Я. Самуйленко. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 267с.

2. Варфоломеев С.Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов /С.Д. Варфоломеев, С.В. Калюжный. – М.: Высшая школа, 1990 - 296с.

3. Производство лекарств по GMP.-М.: Издательский дом «Медицинский бизнес», 2005.-344с.

4. Русанов В.М., Левин И. Лечебные препараты крови.-М.: ИД «Медпрактика», 2004.-284с.

5. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

6. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение/Л.Я. Телишевская. – М.: Мир, 2000 – 295с.

7. Методические рекомендации к контролю питательных сред по параметрам роста микроорганизмов в процессе их культивирования /З.А. Исаева, И.А.Баснакъян, Л.Н. Запорожцев и др. – М., 1980.

8. Досон Р. Справочник биохимика./Р. Досон, Д.

Элиот, У. Элист, К. Джекс. – М.: Мир, 1991. – 543с.
9. СТО 00482861-0015-2002. Вакцина против парагриппа-3 инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота сухая культуральная ассоциированная.
10. ГОСТ Р 50779-42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. – ИПК изд. стандартов, 1999.

Контактная информации об авторах для переписки
Е.В. Сусский – к.в.н., директор ФГУП «Армавирская биофабрика»
В.Т. Ночевный – д.б.н., профессор, В.Н.С. Саратовского НИВИ
В.И. Смоленский – д.б.н., профессор ФГБУ «ВГНКИ»;
Т.В. Ночевная, к.б.н., эксперт, ЗАО «Микроген»

УДК 615.371

Романенко О. А., Тимченко Л.Д., Заерко В.И.
(ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» , ФГУП «Ставропольская биофабрика»)

ПРОБЛЕМЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕПТОСПИР И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Ключевые слова: лептоспиры, питательные среды, гидролизаты, стимуляторы роста микроорганизмов.

Лептоспиры хемоорганотрофные, строго аэробные микроорганизмы, культивируемые при температуре плюс 37…38°С, относятся к семейству Spirochaetaceae и роду Leptospira, традиционно являются труднокультивируемыми микроорганизмами, в связи с чем для их производственного культивирования необходимо наличие в питательной среде длинных цепей жирных кислот и витаминов: тиамин (В1), цианкобаламин (В12). Основным источником азота являются смеси аминокислот, отвечающие питательным потребностям лептоспир [2]. Оптимум pH среды для культивирования лептоспир составляет 7,0 …7,6.

Питательные среды для производственного культивирования лептоспир делятся на сывороточные, полусинтетические и синтетические. К сывороточным питательным средам относятся среда Уленгута, ВГНКИ, Ферворта-Вольфа и др. К полусинтетическим и синтетическим относятся среда Шенберга, Элингаузена, твин-альбуминовая среда, твин-альбуминсывороточная среда Эллиса, альбуминовая среда ГНКИ [4].

Однако, чаще всего в производственных условиях для культивирования лептоспир, благодаря высокой питательности, используются сывороточные среды, или среды в которых сыворотка является важным составным компонентом.

Существует несколько требований, учитываемых при изготовлении сывороточных питательных сред: стерильность, оптимальный показатель pH, содержание необходимых питательных веществ (источники азота, углеродного питания, ростовые вещества, минеральные элементы) и др. [6], а также минимальный уровень опалесценции, позволяющий четко контролировать интенсивность роста лептоспир.

При существующем разнообразии питательных сред для культивирования лептоспир, в состав которых входит сыворотка крови, для предприятий биологической промышленности, остается актуальной проблема достаточного накопления бактериальной массы, необходимого для производства вакцины против лептоспироза животных. По-нашему мнению, такая проблема может быть обусловлена рядом причин, в частности, нестабильностью сывороточного компонента среды, что обусловливает зачастую выраженную опалесценцию